

Znaczenie fazy przedanalizycznej w diagnostyce laboratoryjnej chorób zakaźnych

Dane prezentowane podczas seminarium „Postępy w badaniach
przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.)

The role of preanalytic phase in the laboratory diagnosis
of infectious diseases. Data presented at the seminar “Advances in blood
donor screening” (Warsaw, 5–6 October 2015)

Aleksander Mazur

Szpital Uniwersytecki w Krakowie

J. Transf. Med. 2015; 8: 150–152

Podstawowym zadaniem nowoczesnej diagnostyki serologicznej zakażeń jest szybkie wykrywanie infekcji. Z oczywistych powodów wykrycie zakażenia (i ostateczne postawienie rozpoznania) powinno nastąpić w możliwie najkrótszym czasie od momentu jego dokonania (wniknięcia drobnoustroju do organizmu). Trzeba sobie jednak uświadomić fakt, że znaczna część (o ile nie większość!) badań jest wykonywana nie po to, żeby zakażenie potwierdzić, lecz po to, żeby je wykluczyć! Wiąże się to z koniecznością zapewnienia bezpieczeństwa pacjentom podlegającym inwazyjnej diagnostyce, zabiegom chirurgicznym lub otrzymującym materiał biologiczny w obszarze szeroko pojętej transfuzjologii i transplantologii.

Oczywiste jest, że zarówno pierwsze, jak i drugie z postawionych zadań wymaga uzyskiwania wiarygodnych i jednoznacznych wyników oznaczeń. Obserwowane wraz z kolejnymi generacjami testów zwiększenie czułości analitycznej umożliwia wykrywanie bardzo niewielkich stężeń poszukiwanych markerów. Powoduje jednak, że wśród wyników badań wskazujących na zakażenie pojawia się pewna liczba wyników fałszywie reaktywnych. Jest to cena za bardzo wysoką czułość testu, pozostającą zawsze w jakimś stopniu w niezgodności z jego swoistością. Problemy w obszarze swoistości testów i pojawianie się fałszywie reak-

tywnych wyników (np. na skutek występowania reakcji krzyżowych) wymuszają stosowanie testów weryfikacyjnych, swoiście potwierdzających występowanie poszukiwanych markerów zakażenia. Zwiększają one jednak koszty całej diagnostyki oraz wydłużają niekiedy czas potrzebny do uzyskania ostatecznego wyniku. Wskazane jest zatem organizowanie diagnostyki w taki sposób, aby w maksymalnym stopniu unikać wyników wątpliwych, fałszywie reaktywnych i wymagających dalszej weryfikacji. Postęp technologiczny ma znaczny wpływ na jakość uzyskiwanych wyników (np. kolejne generacje testów bardziej odporne na wpływ czynników zależnych od fazy przedanalizycznej badania), jednak opracowanie skutecznego testu przesiewowego dobrej jakości, wykrywającego zakażenia drobnoustrojami łatwo mutującymi i przez to występującymi w wielu odmianach, genotypach i podtypach (jak np. HCV, HBV, HIV), jest zadaniem bardzo trudnym. Obszar ten — zależny od charakterystyki samych drobnoustrojów — jest trudny do kontrolowania. Są również inne czynniki, na które nie mamy wpływu, takie jak występowanie u osób badanych zjawisk immunologicznych powodujących reakcje krzyżowe i fałszywie reaktywne wyniki oznaczeń. Jednak za pomocą dostępnych narzędzi możemy w stosunkowo łatwy i tani sposób wpłynąć na ograniczenie liczby niepotrzebnie

Adres do korespondencji: lek. Aleksander Mazur, Zakład Mikrobiologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, ul. Kopernika 19, 31–501 Kraków, e-mail: mazural@wp.pl

wykonywanych powtórnych oznaczeń (weryfikacja próbek wstępnie reaktywnych) oraz liczby zlecających znacznie droższych i czasochłonnych testów potwierdzających. Z ekonomicznego i organizacyjnego punktu widzenia z pewnością warto się nad tym zagadnieniem głębiej zastanowić.

Jeżeli projektujemy zasady funkcjonowania pracowni oznaczającej serologiczne markery zakażeń, w której jednym z priorytetów jest szybkość uzyskiwania wyników i minimalizacja błędów mających miejsce w trakcie fazy przedanalizycznej, kluczowym zagadnieniem powinien być właściwy wybór materiału do badania. W celu uproszczenia procedury pobierania krwi, dla uniknięcia ewentualnych pomyłek warto wprowadzić jeden uniwersalny sposób jej zabezpieczania. W polskiej praktyce laboratoryjnej materiałem najczęściej wykorzystywanym do oznaczania serologicznych markerów zakażeń jest surowica krwi, uzyskiwana poprzez oddzielenie jej od skrzepu w trakcie wirowania. Powszechnie wiadomo, że uzyskanie dobrej surowicy do badań może niekiedy nastręczać pewnych trudności. Proces pełnego wykrzepiania wynaczynionej krwi jest rozciągnięty w czasie i przyjmuje się, że aby móc uzyskać surowicę do badań, należy odczekać z wirowaniem co najmniej 30 minut. Jednak stosowanie leczenia przeciwkrzepliwego przedłuża ten proces o czas trudny do określenia, bo jest on indywidualnie zmienny. Leczenie przeciwkrzepliwie stosuje się zarówno u wybranych pacjentów hospitalizowanych, jak i ambulatoryjnych. Zbyt wczesne oddzielenie surowicy takich pacjentów i następujące później dalsze wykrzepianie jest źródłem problemów, takich jak zatykanie igły próbkującej skrzepliną, zanieczyszczanie drenów i komór analizatora „lepkiem” białkowym filmem czy uzyskiwanie fałszywie dodatnich wyników oznaczeń na skutek różnych interferencji, wynikających z obecności w badanym roztworze fragmentów włókienka. Niestety te potencjalne „specjalne” właściwości krwi konkretnego pacjenta nie są w laboratorium znane, ponieważ tego typu danych dotyczących leczenia nie udostępnia się rutynowo wraz ze skierowaniem na badania. Zatem jest to ważny czynnik fazy przedanalizycznej, nad którym nie mamy w praktyce żadnej kontroli. Można go jednak wyeliminować już na początku poprzez zastąpienie surowicy osoczem, zabezpieczonym przy pobraniu odpowiednim antykoagulantem. Z punktu widzenia metody ECLIA, wykorzystywanej w analizatorach linii Elecsys® i cobas®, optymalnym antykoagulantem jest K3EDTA, który spełnia przyjęte na wstępie założenia oraz — co bardzo ważne — został dopuszczony do wszystkich

oznaczeń przez producenta analizatora i zestawów odczynnikowych. Z oczywistych względów (również prawnych — w przypadku ewentualnych wątpliwości w odniesieniu do wartości wyników) nie powinno się wykonywać oznaczeń w materiale innym niż zezwala specyfikacja producenta. Wybór ten jest jednak korzystny również z innych względów. Niewielka objętość dodawanego EDTA sprawia, że takie osocze znakomicie nadaje się do oznaczeń ilościowych, ponieważ nie powoduje efektu rozcieńczenia analitu. Uniwersalność osocza praktycznie eliminuje błędy związane z nieprawidłowym dobraniem antykoagulantu przy pobieraniu krwi, pozwala również na łączne wykonywanie wszystkich oznaczeń z jednej próbki. Dodatkową, lecz istotną korzyścią wynikającą z zastosowania EDTA jest możliwość wykonywania w tak zabezpieczonym materiale badań molekularnych. W przypadku wątpliwości, w celu weryfikacji i poszerzenia diagnostyki ten sam uniwersalny materiał może być zatem użyty do dalszych badań. Porównując próbówki o podobnej objętości nominalnej, łatwo zauważyć, że odzysk osocza znad równo odwirowanych krwinek jest znacznie lepszy niż znad nierównej i sięgającej znacznie wyżej powierzchni skrzepliny w przypadku surowicy. Wyższy nad krwinkami słup cieczy (osocza!) pozwala na bezpieczne i „czyste” próbkowanie przez analizator z próbówki pierwotnej. W przypadku próbek z krwią pobraną „na skrzep” skrzeplina często — pomimo wirowania — sięga tak wysoko, że analizator próbując trafia igłą w skrzep (powodując jej zatkanie i stratę odczynników przy braku wyników), lub próbkuje surowicę tuż nad jego powierzchnią wraz z fragmentami skrzepliny i uwiecznionymi w niej krwinkami (mogącymi powodować zafałszowanie wyniku). W konsekwencji oba zjawiska powodują konieczność wykonywania powtórnych badań weryfikacyjnych, co generuje dodatkowe koszty. Nie bez znaczenia jest również rodzaj próbówki pierwotnej, do której pobierana jest krew i z której następnie próbkowane jest przez analizator osocze. Szersza próbówka ułatwia pobieranie materiału przez końcówkę próbującą bez ryzyka kontaktu z brzegiem pojemnika, lecz obniża słup cieczy. Węższa próbówka, przy tej samej objętości materiału, podwyższa słup cieczy nad krwinkami, pozwalając na swobodniejsze zagłębianie się igły próbkującej bez ryzyka aspiracji krwinek.

Kolejnym bardzo ważnym zagadnieniem mającym praktyczny wpływ na jakość uzyskiwanych wyników i częstość występowania fałszywych reaktywności jest odpowiednie wirowanie materiału do

badania. Powszechnie wiadomo, że źle odwirowane osocze czy w jeszcze większym stopniu surowica mogą być przyczyną nieprawidłowych wyników badań oraz kumulującego się w czasie zanieczyszczenia analizatora. Zgodnie ze wskazaniem instrukcji i zaleceniami producentów zestawów odczynnikowych po uzyskaniu dodatniego wyniku oznaczenia próbkę należy ponownie odwirować i ponownie oznaczyć, aby uniknąć skutków ewentualnego przypadkowego błędu. Po takiej weryfikacji można dla próbki materiału uzyskać wynik powtarzalnie reaktywny (po drugim oznaczeniu dodatnim) lub powtarzalnie niereaktywny (dopiero po trzecim oznaczeniu — pierwotnym i 2 weryfikacyjnych!). Ponieważ powtarzanie badań każdorazowo generuje dodatkowe koszty, w dobrze pojętym interesie wykonującego badania jest zapewnienie właściwych warunków wirowania już w fazie wstępnej badania pierwotnego. Doświadczenia własne wskazują, że stosowane w trakcie wirowania ciążenie na poziomie około 3700–4000 g

w ciągu 8–10 minut pozwala na uzyskanie dobrej jakości osocza do badań. Zabieg ten w połączeniu z zastosowaniem przez analizator wody o bardzo dobrej jakości pozwala utrzymać czystość toru pomiarowego i sprzyja uzyskiwaniu prawidłowych wyników już przy pierwszym oznaczeniu.

Podsumowując, należy stwierdzić, że stosowanie nawet prostych, lecz przemyślanych rozwiązań może w sposób niemal bezkosztowy wpływać na skrócenie czasu diagnostyki, zmniejszać liczbę błędnych rozpoznań oraz przyczynić się do zredukowania kosztów funkcjonowania laboratorium.

Konflikt interesów

Praca powstała na podstawie wykładu wygłoszonego podczas seminarium „Postępy w badaniach przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.), organizowanego przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. pod nadzorem merytorycznym Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.